Feel so Bio 19キットシリーズ

#003 PCR キット

取扱説明書

ver.1.3

コスモ・バイオ株式会社

目次

本キットの特徴	… 2
キット使用時に必要な試薬・機材等の一覧	… 3
内容物について	… 4
分注について	… 5
PCR法の原理	… 6-8
電気泳動の原理	… 8-10
電気泳動の準備と手順	… 11
実験手順	… 12,13
DNA染色の推奨方法	… 14
付録1　DNAポリメラーゼとは	… 15
付録2　電気泳動法	… 16

本キットの特徴

本キットは、polymerase chain reaction （PCR） 法によってラムダファージのDNA配列を増幅する実験を行うキットです。

本キットを通して実際にPCR法を体験することで、現在のバイオテクノロジーの根幹技術であるPCR法の原理と応用を理解することができます。

PCR法は、1980年代に開発された技術であり、既にバイオテクノロジーの根幹を成す技術に発展しています。また、その開発者にはノーベル賞が授与されました。PCR法は、現在のバイオテクノロジーを理解する上では欠かせないキーワードです。

キット使用時に必要な試薬・機材等の一覧

キット内容 【生徒20名分】

・テンプレートDNA	(70μL)	1本
・PCRプライマーF	(70μL)	1本
・PCRプライマーR	(70μL)	1本
・マスターミックス	(200μL)	1本
・精製水	(200μL)	1本
・ローディングバッファー	(100μL)	1本
・DNAマーカー	(60μL)	1本
・40倍濃縮電気泳動バッファー	(25mL)	1本
・アガロース	(2g)	1袋
・PCRチューブ	(20本)	1袋
・マイクロチューブ	(50本)	1袋
・取扱説明書 （本書）		1冊

本キット以外に必要な試薬・機材一覧

・サーマルサイクラー		1台
・マイクロピペット	20μL用	5本（各班1本）
	200μL用	1本（分注用）
・マイクロピペット用チップ		6箱（各班1個及び予備）
・電気泳動槽		1～2個
ミニゲルを2個泳動できる個数をご用意下さい。		
・DNA染色液		適量
株式会社アドバンス社のMupid Blueを推奨しています。		
（Mupid Blueを用いた染色法はp15に記載しました。）		
・染色用タッパー		5個（各班1個）
・脱色用タッパー		5個（各班1個）

※キットに含まれる電気泳動関係の試薬の量は、株式会社アドバンス社の 電気泳動槽、Mupid Sの使用を想定しております。

※機材につきましては弊社で取り扱っております。ご入用の際にはお問合せ下さい。

内容物について

テンプレートDNA

ラムダファージから精製したゲノムDNAです。DNA分解酵素が働かないようにTEバッファーに溶かしてあります。
-20℃にて保存し、使用前に氷上で融解させてください。

PCRプライマー

ラムダファージのDNA配列に特異的なプライマーで、約500bpの領域を増幅することができます。DNA分解酵素が働かないようにTEバッファーに溶かしてあります。
-20℃にて保存し、使用前に氷上で融解させてください。

マスターミックス

タックDNAポリメラーゼ,dNTPs（単体のヌクレオド）,$MgCl_2$,PCRバッファーの混合溶液です。2000塩基以下のPCRに最適化されています。
凍結融解を繰り返しますと著しく酵素活性が低下します。一旦融解したマスターミックスは、冷蔵で保存し1週間以内にお使いください。

精製水

DNA分解酵素およびRNA分解酵素が含まれていない精製水です。
－20℃にて保存してください。

PCRチューブ

200ul用のPCRチューブです。お客様のご使用になられるサーマルサイクラーの推奨するPCRチューブをご確認の上、ご使用ください。

アガロース

核酸、タンパク質などの生体高分子を完全に除去した精製アガロースです。高温多湿をさけ、常温にて保存してください。

ローディングバッファー

DNAサンプルを電気泳動する際に使用します。常温にて保存してください。色素を含み、手や衣服につくと落ちにくいので、取り扱いには十分にご注意ください。

40倍濃縮電気泳動バッファー

40倍の濃度に濃縮したTAE（トリス-酢酸-EDTA）バッファーです。アガロースゲルの作成および、DNAサンプルをアガロースゲル電気泳動法により分離する際の泳動バッファーとして使用します。4℃にて保管してください。ゲル作製および電気泳動用バッファーとして使用の際は、精製水にて40倍に希釈してご使用ください。

分注について

班構成

本実験キットでは4人1班（実験は2人一組）を推奨しています。

機材一班分

テンプレートDNA	…12μL
PCRプライマーF	…12μL
PCRプライマーR	…12μL
マスターミックス	…35μL
精製水	…35μL
ローディングバッファー	…18μL
DNAマーカー	…10μL
40倍濃縮電気泳動バッファー	…100mL※（40倍希釈後）
アガロース	…1個
PCRチューブ	…2本

※内容物についての項、及び実験手順の項に従って試薬を溶解してください。

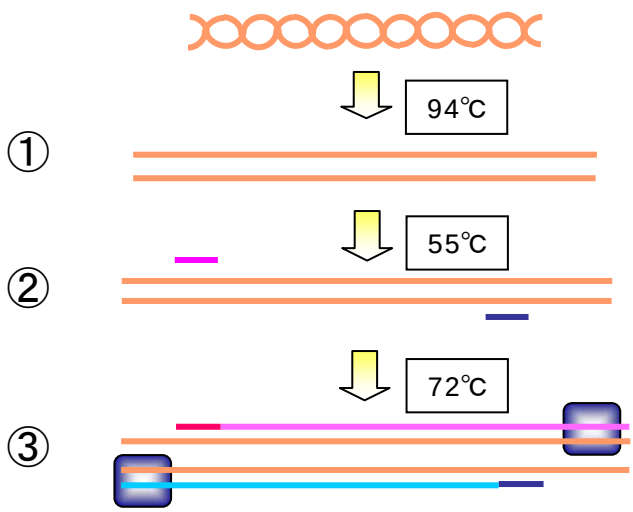
PCR法の原理

PCR法とは

Polymerase Chain Reaction法（PCR法）は、短時間かつ簡便に目的とするDNA断片を大量に増幅する技術です。この技術は特定の遺伝子配列を人工的に増幅できるため、バイオサイエンスの研究において不可欠な技術となっています。さらにPCR法は、病原菌感染の検査や遺伝子組換え作物混入の検査といった医療や食品の安全管理の分野にも応用されており、その用途は多岐に渡っています。

PCR法の原理

PCR法では、増幅したい塩基配列の両端に相補的な、20塩基前後のオリゴヌクレオチド鎖からなるプライマーを足がかりとし、耐熱性のDNAポリメラーゼを用いてDNA塩基配列を増幅していきます。この操作は、3段階の温度変化を経て行われます。それを繰り返し行なうことで、大量のDNA塩基配列を得ることができるのです。下図は、1サイクル目の反応を表したものです。



STEP1
DNA二本鎖の熱変性

STEP2
プライマーとDNA鎖が2本鎖を形成

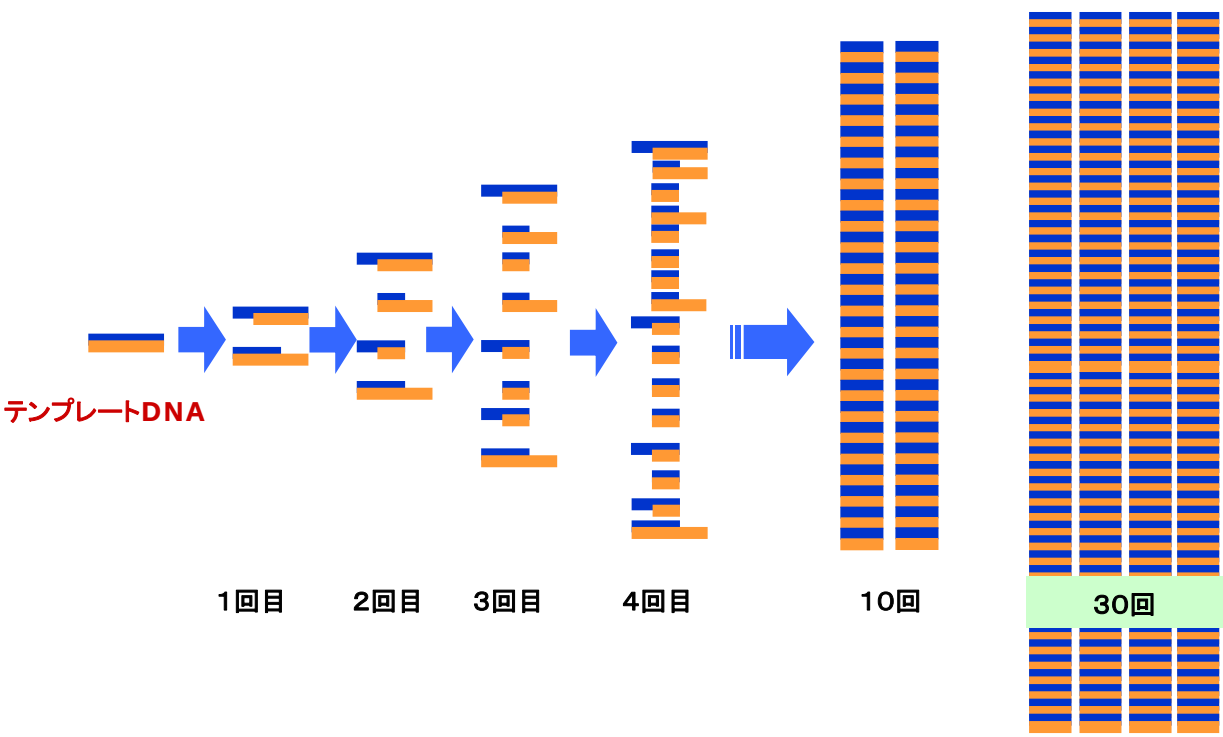
STEP3
耐熱性ポリメラーゼによる伸張反応

① テンプレートDNA（増幅したい配列の鋳型となるDNA鎖）・耐熱性ポリメラーゼ・プライマーなどを加えた反応溶液を94℃まで加熱することで、2本鎖であったテンプレートDNAの水素結合を切断し、1本鎖に解離させます。

② 次に、反応溶液の温度を55℃～60℃程度まで下げることによりプライマー配列をテンプレートDNAの相補的な塩基配列に結合させます。プライマーは20塩基程度の1本鎖DNAであり、テンプレートDNAの特定の配列に特異的に結合するよう設計してあります。1本鎖に解離したテンプレートDNAとプライマーDNAが2本鎖を形成し、耐熱性ポリメラーゼがDNA鎖を合成するための「足場」となります。
（※この段階の温度はプライマーの長さやプライマー配列中のGC含有率に依存します。本キットをご使用になる際は取扱説明書記載の温度に従ってご使用ください）

③ さらに、反応液を耐熱性ポリメラーゼが働くための至適温度である72℃まで上昇させることで、DNA鎖が合成されます。

この作業を連続して行うことで、下図のように増幅したいDNA断片が大量に増幅されます。



3サイクル目以降の反応では、設定したプライマーの間にあるDNA断片が急速に増幅されます。PCR反応では、理論的には無限大にDNAを増幅できますが、実際には耐熱性ポリメラーゼの失活・プライマーやdNTPの枯渇などによって増幅率は低下し、得られるDNA断片はほぼ一定量となります。

アガロースゲル電気泳動の原理

アガロース電気泳動法とは

アガロース電気泳動法は、DNAやRNAなどの核酸をそれらの電気的な性質を利用して分離する方法です。核酸は「－」の電荷を帯びているため、電場に置かれると、アガロース（※）のゲルの網目構造内を＋極側に移動します。長いDNA断片は網目構造内をゆっくりと（引っかかりながら）動くのに対して、短いDNA断片はより速く（あまり引っかからずに）動くことから、アガロースゲル電気泳動法では、DNA断片を長さによって分離することが可能です。この方法はバイオテクノロジーの研究においてDNA断片の際に用いられる最もポピュラーな方法であり、現在のバイオテクノロジーを支える最も基本的な技術です。

※アガロースとは？

アガロースとは、「寒天」の主要な成分のことです。二種類の糖が結合しあって網目状の構造をとることから、生体高分子、特にDNAの分子量を分析する際によく利用されます。

DNAの電気的性質

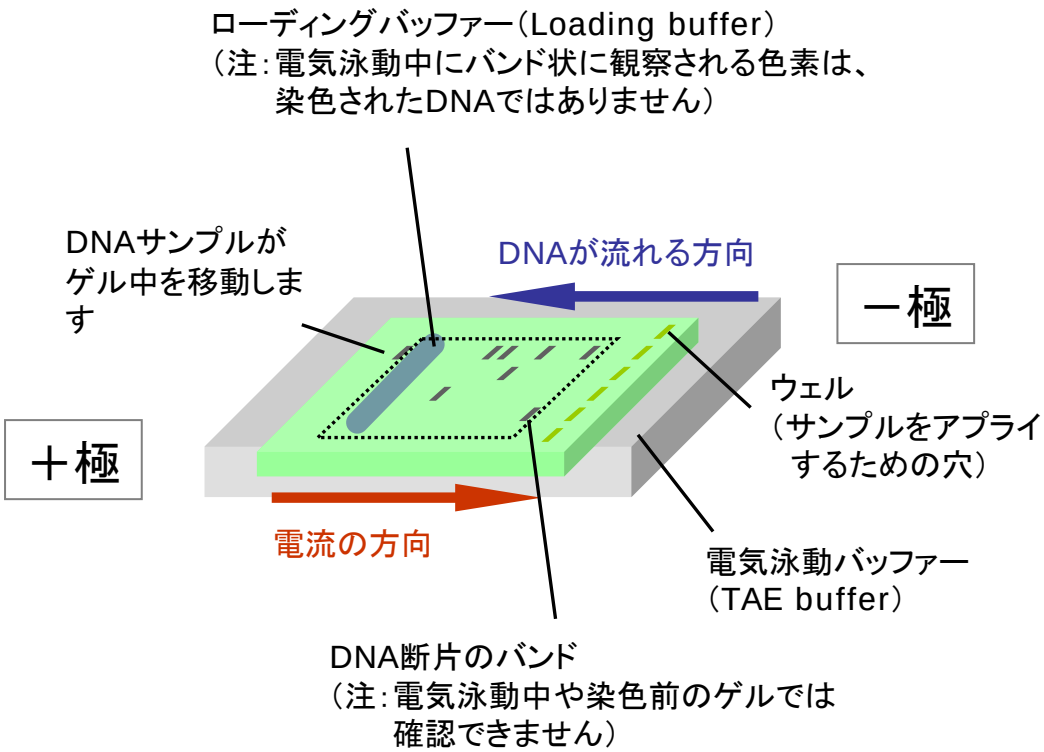
DNAは、リン酸基・塩基・デオキシリボース（糖の一種）によってできる「ヌクレオチド」とよばれる分子が直鎖状につながった構造をとっています。このうちリン酸基と塩基が荷電しています。

DNAの場合、塩基の荷電は二重鎖構造をとるために打ち消されているので、水溶液中ではリン酸基のみが荷電しており、したがってDNAはヌクレオチド数、すなわち分子量（※）に比例した電荷を持っていることになります。これはDNAの電気的な性質で最も重要な点です。

※DNAはヌクレオチドが直鎖状につながった構造をとるため、分子量はそのヌクレオチド数に比例します（塩基の種類によって多少の誤差が生じます）。一般的にDNAの大きさは分子量で表わさずヌクレオチドの長さ（塩基対数、base pair：bp）で表わします。

アガロースゲル電気泳動法では、このようなDNAの電気的な性質を利用します。アガロースによるゲルマトリックス（アガロースゲル）内に電圧をかけることで電場を生じさせ、DNA断片を長さ（単位は塩基対を意味するbp：base pair）によって分離します。DNAは二重らせんとよばれる単一な構造をとっているため、DNAは分子量による移動度の差によって分離することができます。

下の図は、アガロースゲル電気泳動の模式図を示しています。アガロースゲル電気泳動を行う際には、サブマリン電気泳動槽とよばれる機器を使用します。まず電気泳動槽を、導電性でかつDNAの分解が起こりにくいTAEバッファーで満たし、TAEバッファー中にアガロースゲルを静置します。アガロースゲルには、ウェルとよばれるサンプルを注入（アプライ）するための穴があり、ここにDNAサンプルをマイクロピペットを用いてアプライします。DNAサンプルのアプライ後のゲルに電圧をかけ電流を流すことでDNA断片をサイズによって分離することができます。



DNAサンプルを電気泳動する際には、あらかじめDNAサンプルをローディングバッファーと混和します。これによりDNAサンプルは、泳動バッファー中に拡散することなく、ウェル内にアプライすることが可能となります。ローディングバッファーには、電気泳動中にサンプルの移動度の目安となる色素や、ウェルにDNAサンプルを沈ませるためのグリセロールなどが含まれています。

あらかじめDNA断片のサイズの分かっているDNAサンプルを「DNAのモノサシ」として隣のレーンに電気泳動することで、未知のサンプルの分子量を検討することも可能です。

電気泳動の終了後は、DNA断片を可視化するために染色します。DNA染色に用いられる試薬としては、エチジウムブロマイド（EtBr）、Mupid Blueなどが挙げられます。EtBrは検出感度に優れていますが、DNAの二重鎖の間に入り込む（インターカレーションする）物質であり、発がん性が認められます。また、DNA断片のバンドの観察の際に紫外線ランプが必要となるため、ビニール手袋を必ず着用し、防護メガネを使用するなど、取扱いには十分な注意が必要です。本キットでは、安全なMupid Blueの使用を推奨します。

電気泳動の準備と手順

実験の手順（実験前に準備していただくこと）

①　電気泳動バッファーの作成

40倍濃縮泳動バッファーを975mLの精製水で40倍に希釈します。キットで使用を推奨している電気泳動層、Mupid-Sでは電気泳動バッファーを約100mL/台　使用します。

②　アガロースゲルの作成

１）300mLの三角フラスコに1.4gのアガロースを入れ ①で作成した1xTAEバッファー200mLを加えよく混ぜます。三角フラスコの口をラップで軽く閉じ電子レンジで加熱してアガロースを完全に融解させます。この作業はアガロースの粒子が見えなくなるまで行ってください。加熱の際は、沸騰による噴出に注意してください。なお、この作業は突沸した水蒸気が手にかかるなどやけどの危険性がありますので、必ず軍手の上にビニール手袋をして作業を行ってください（**この作業はやけどの危険があります。必ず指導者が行うようにしてください**）。

２）溶解させたアガロースは、電気泳動槽付属のゲルメーカーを用いて成型します。②で融解したアガロースを、ある程度（50℃程度）まで冷ました後、ゲルメーカーに流し込み、上からウェルを作成するためのコームを差し込みます。アガロースが固まるまで上からアルミホイルで覆い、静置してください。

※200mLのアガロース溶液で、小さいゲルが約8枚、大きなゲルでは4枚作成できます。ゲルメーカーが一個しかない場合で、小さいゲルを4枚以上作成したいときには、１）のステップで、0.7gのアガロースを100mlの泳動バッファーに溶かすなどして、小分けにゲル作成を行なってください。また、一度固まってしまったゲルでも、再度レンジで温めることで溶解し、ゲルを作成することが可能です。

作成したアガロースゲルは、希釈後の泳動バッファーに浸した状態で一ヶ月程度常温保存が可能です。また、使用前にはウェルの底に穴が開いていないことを目視で確認してください。

実験手順

＜PCR実験＞

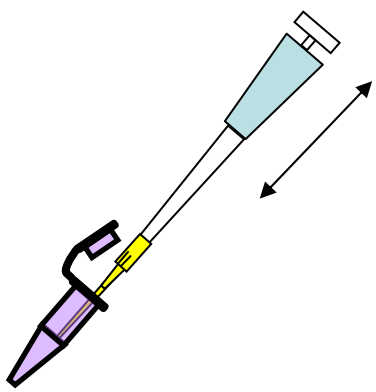
1）テンプレートDNA、PCRプライマーF、PCRプライマーR、マスターミックス、精製水を氷上で融解させる。

2）テンプレートDNA、PCRプライマーF、PCRプライマーRを5uLずつ、PCRチューブに加える。

3）2）のPCRチューブにマスターミックス15uLを加え、ピペッティングにより溶液を均一にする。

4）サーマルサイクラーに、3）のPCRチューブにセッティングする。
※サーマルサイクラーは以下のように設定する。

95℃　3分
95℃　30秒
58℃　30秒　｝35 サイクル
72℃　45秒
72℃　5分
4℃　Hold



※ネガティブコントロールについて
テンプレートDNA・プライマー・ポリメラーゼのいずれか、もしくはサーマルサイクラーでの処理を除くことで、ネガティブコントロールとして扱えます。

※注意点
いずれの操作も、チューブ中のサンプルが温まらないよう、チューブのできるだけふたの方を持つように注意してください。

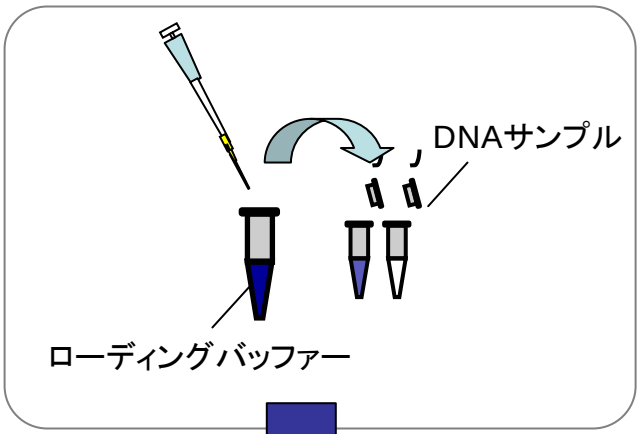
実験の手順

① 電気泳動槽の準備

電気泳動槽に電気泳動バッファーを加え、電気泳動槽内のマイナス極側にウェルが来るようにアガロースゲルをセットします。アガロースゲルのウェルが必ず電極と平行になるようにセットしてください。使用する電気泳動バッファーの量は、電気泳動槽によって異なりますので、電気泳動槽の取扱説明書に従い、適切な量をご使用ください（参考：Mupid-Sでは約100mL程度）。

② DNAサンプルの調整

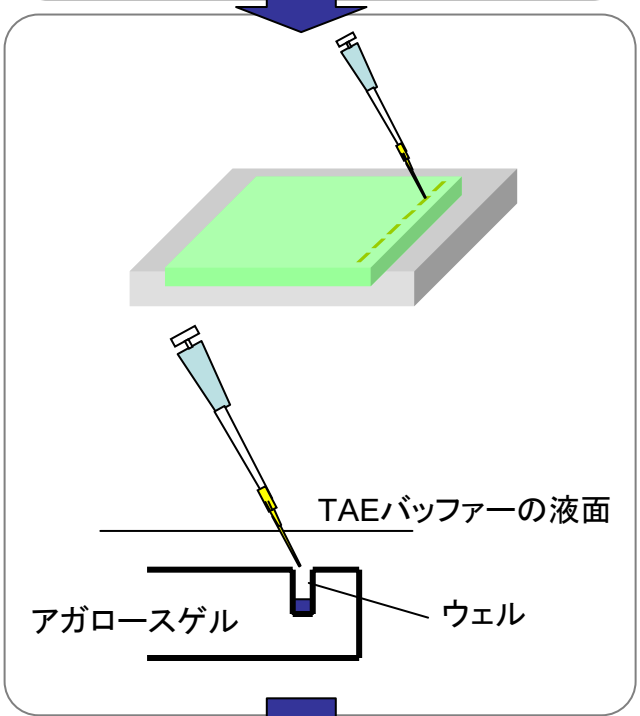
本キット添付のローディングバッファーを5μLずつPCRの終了したPCRチューブに加えよく混ぜます（合計35μL）。DNAマーカーには2μLのローディングバッファーを加えてよく混ぜてください。



③ DNAサンプルのアプライ

PCRサンプルを別々のウェルにアプライします。

アプライは、右図のようにチップの先をウェル内まで入れないようにします。チップの先端でウェルを破壊しないよう、細心の注意を払ってください。

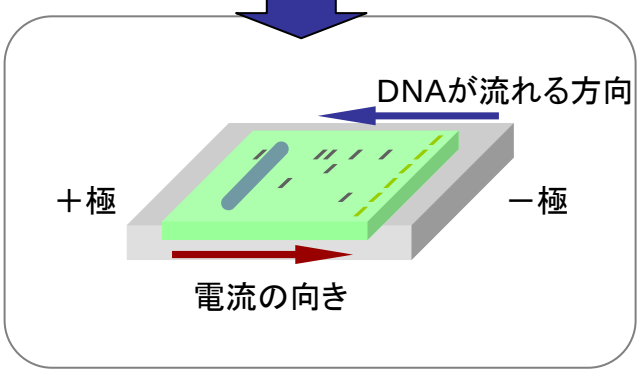


④ アガロース電気泳動

電気泳動槽の電源スイッチを入れ、電気泳動を開始します。DNAはマイナスの荷電を持っていますので、プラス極側に移動します。くれぐれも感電にご注意ください（参考：Mupid-Sでの電気泳動条件は100ボルトで20分程度となります）

⑤ アガロースゲルの染色

次ページ「DNA染色の方法」をご覧ください。



DNA染色の推奨方法

＜Mupid Blueを使用したDNA染色法＞

Mupid Blue

50倍に濃縮されたDNAの染色液です。電気的性質によってDNAと結合することで青色を呈するため、電気泳動の結果を確認することが可能です。インターカレーション型と呼ばれる染色液と異なり、発がん性がなく安全な試薬です。常温にて保存し、使用の際は精製水にて50倍に希釈してご使用ください。

DNA染色液による染色では脱色の操作が必要となります。脱色の操作では精製水を用います。

※ DNA染色液は無害ですが色素を含んでおり、衣服・皮膚などに付くと汚れますので取扱いの際にはビニール手袋・白衣等を着用することをお勧めします。

① DNA染色液を精製水で50倍希釈し、タッパーに入れる。脱色用の水をタッパーに用意しておく。

② 電気泳動の終わったアガロースゲルをDNA染色液のタッパーに入れ、2分間ゆっくりと手で振盪する（2分以上染色を続けると脱色がきれいにできなくなりますので、時間を厳守してください）。

⑤ 精製水にアガロースゲルを移し、DNA断片のバンドが確認できるまで精製水を交換しながらゆっくりと手で振盪する。

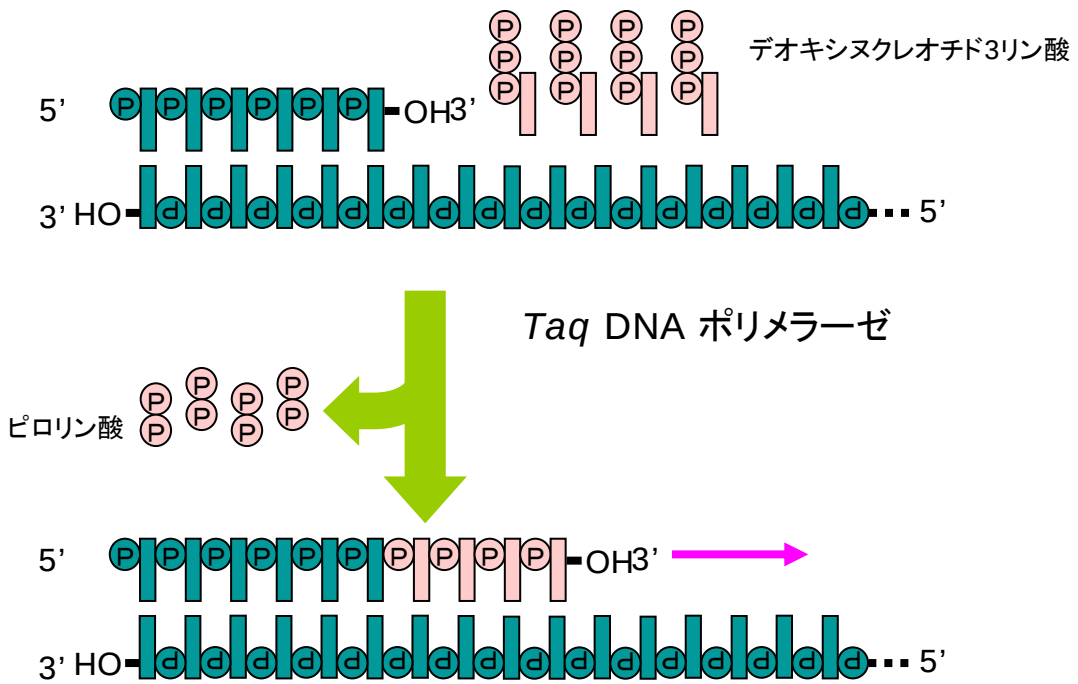
⑥ 観察（デジタルカメラ等でアガロースゲルを撮影することが可能です。

付録1　DNAポリメラーゼとは

ポリメラーゼとはヌクレオチドの重合反応を触媒する酵素の名称です。DNAもRNAもヌクレオチドの重合体なので、ポリメラーゼは主に核酸の合成反応を行いたい時に使用されます。

ポリメラーゼは、鋳型鎖および合成鎖となるポリヌクレオチドに注目すると3種類に分類することができます。それらは、すなわちDNAポリメラーゼ（鋳型：2本鎖DNA、合成鎖：2本鎖DNA）、RNAポリメラーゼ（鋳型：2本鎖DNA、合成鎖：1本鎖RNA）、逆転写酵素（鋳型：1本鎖RNA、合成鎖：1本鎖DNA）です。

これらのポリメラーゼの中で最もポピュラーなポリメラーゼはDNAポリメラーゼです。その中でも耐熱性細菌から単離された高熱に強いDNAポリメラーゼ（*Thermus aquaticus* 由来のDNAポリメラーゼを改変した*Taq* が広く用いられています。本キットでも*Taq* DNAポリメラーゼを用いております）を用いたPCR法は、現在の遺伝子工学において根幹をなす非常に重要な技術となっています。また、遺伝子のクローニングの際には、PCR反応産物を制限酵素で切断しDNAリガーゼで繋ぐことにより行われています。DNAリガーゼの働きの理解には、弊社「DNA結合キット」がお勧めです。



付録2　電気泳動法

泳動バッファー

DNAの電気泳動では、一般にTAE bufferやTBE bufferが用いられます。TAE bufferは数kb以上の比較的長いDNA断片の分離に適しているのに対して、TBE bufferはそれよりも短いDNAの分離に適しています。

アガロースゲルの濃度

電気泳動法によるDNAの分離実験では、ゲルの作成の際のアガロースの濃度が非常に重要となります。アガロースの濃度が上がれば上がるほどゲルマトリックス分子とDNA断片の相互作用は強くなりDNA断片の移動度が小さくなるため、より細かいDNA断片の分離が可能となります。分離したいDNA断片の長さによって適当なアガロース濃度を選択することが大切です。本キットでは、0.7%のアガロースゲルを使用することを推奨しています。

アガロース濃度 (%)	分離できるDNA断片の長さ (bp)
0.6	1,000~20,000
0.7	800~10,000
1	500~7,000
1.2	400~6,000
1.5	200~3,000
2	100~2,000

ご使用上の注意

本製品は、バイオ教育を目的として開発されたキットです。本取扱説明書に記載されたプロトコル以外での使用につきましては、保証の限りではございません。

商品のご返品について

商品のご返品につきましては、弊社の確認を必要とさせていただきます。この確認なしでのご返品はご遠慮ください。適切な保存、ご使用をされていない製品についてはご返品をお受けできない場合がございます。また、品質保持のために返品された製品を再販することは一切ございません。

カスタマーサポート

Feel so Bioシリーズ　カスタマーサポート係
TEL：03-6277-8041
FAX：03-6277-8042
Mail：info@feelsobio.net

※FAXをご利用の場合は、同封のFAX用紙にご記入の上ご送信ください。

製造・販売元

株式会社リバネス http://www.leaveanest.com

〒160-0004
東京都新宿区四谷2-8 藤井ビル5F
TEL 03-6277-8041
FAX 03-6277-8042

販売

コスモ・バイオ株式会社

〒135-0016　東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
TEL：(03) 5632-9610　FAX：(03) 5632-9619
e-mail：mail@cosmobio.co.jp
URL：http://www.cosmobio.co.jp/